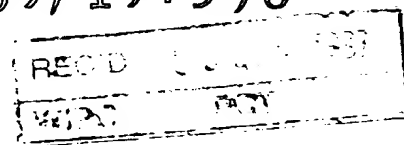
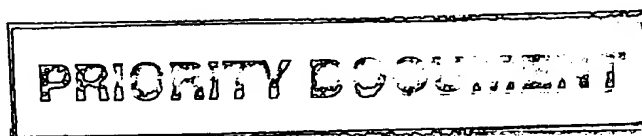


09/194598



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION



COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **29 AVR. 1997**

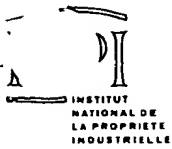
Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 06
Telephone 01 53 04 53 04
Telecopie 01 42 93 59 30

000,000



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

certificat
N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES 31 MAI 1996 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 96 06725 - DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 DATE DE DÉPÔT 31 MAI 1996		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET REGIMBEAU 26, Avenue Kléber 75116 PARIS n° du pouvoir permanent 235664 D16200 NA références du correspondant numéro de la demande 45 00 92 02 date	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° date			
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> diffère <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
Titre de l'invention (200 caractères maximum) Génome végétal recombiné, mitochondrie et cellule le contenant, et procédé de sélection d'une stérilité mâle cytoplasmique chez une plante du genre cichorium			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination FLORIMOND DESPREZ VEUVE ET FILS Nationalité (s) Française Adresse (s) complète (s) 3, rue Florimond Desprez, 59242 CAPPELLE-EN-PEVELE Pays FR		Forme juridique SOCIÉTÉ ANONYME À CONSEIL D'ADMINISTRATION	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/> Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) M. Florimond Desprez 921227		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI [Signature]	

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9606725

TITRE DE L'INVENTION : Génome végétal recombiné, mitochondrie et cellule
le contenant, et procédé de sélection d'une stérilité mâle
cytoplasmique chez une plante du genre cichorium

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

FLORIMOND DESPREZ VEUVE ET FILS
3, rue Florimond Desprez, 59242 CAPPELLE-EN-PEVELE

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DELESALLE Louis
1bis, rue de Thouars
59242 CAPPELLE EN PEVELE, FR

DHELLEMES Charles
33, rue Ladrerie
59242 CAPPELLE EN PEVELE, FR

DESPREZ Michel
Les Diablotins
Rue Florimond Desprez
59242 CAPPELLE EN PEVELE, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

31 mai 1996

CABINET REGIMBEAU

Michel Desprez
921227

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
diffiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
11, 10			X	09/10/96	14 OCT. 1996 - S R

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

La présente invention se rapporte à l'utilisation de séquences nucléotidiques permettant de conférer une stérilité mâle de type cytoplasmique à des plantes du genre *Cichorium*.

5 Le genre *Cichorium* rassemble des plantes présentant un grand intérêt agro-alimentaire, comme les divers types de chicorée ou les endives.

Il s'agit de plantes possédant à la fois des systèmes de reproduction mâle et femelle, et qui ont donc une capacité à s'autoféconder. Un tel évènement est indésirable lorsque l'on souhaite effectuer des croisements
10 avec une plante d'une autre variété, en vue de l'obtention d'hybrides.

Chez *Cichorium intybus*, des plantes à stérilité mâle nucléaire ont déjà été proposées. Cependant la stérilité mâle cytoplasmique constitue une solution d'intérêt pour la production d'espèces hybrides.

15 La stérilité mâle cytoplasmique est une caractéristique transmise par le parent femelle d'une plante (hérédité maternelle), et qui prévient la formation de pollen viable. Une stérilité mâle de bonne qualité ne doit pas affecter la fertilité femelle de la plante, pour permettre son croisement avec des plantes mâles fertiles.

Il est donc souhaitable de pouvoir disposer d'un système conférant
20 une telle stérilité mâle cytoplasmique, qui soit stable.

Il est également souhaitable de disposer d'un marqueur fiable de cette stérilité mâle cytoplasmique permettant la sélection des cellules végétales avant même le développement d'une plante complète présentant l'ensemble des caractères phénotypiques.

25 C'est pourquoi la présente invention a pour objet un génome végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte des gènes spécifiques des chicorées et une séquence nucléotidique conférant une stérilité mâle, portée par la séquence orf 522 du tournesol, ou par une séquence présentant au moins 50%, et de manière avantageuse, au moins 90%
30 d'homologie avec ladite séquence orf 522.

La séquence orf 522 est une séquence qui a été mise en évidence chez le Tournesol (*Helianthus*), notamment *H. annuus*, où elle semble associée à une stérilité mâle cytoplasmique (Köhler et al, *Mol. Gen. Genet.*, 1991, 227 : 369-376).

5 La Demanderesse a trouvé que la présence de cette séquence orf 522 dans le génome d'une plante du genre *Cichorium* était liée à une stérilité mâle cytoplasmique.

Des séquences convenant à la mise en oeuvre de l'invention comprennent des séquences portées par la séquence orf 522 telle qu'elle a
10 été précédemment décrite, ainsi que par des séquences présentant au moins 50% et de préférence au moins 80% de similarité. Des séquences appropriées présentent avantageusement 90% de similarité avec ladite séquence orf 522, et comprennent en particulier les séquences codant pour la même protéine, compte tenu de la dégénérescence du code
15 génétique, ou pour une protéine dans laquelle certains acides aminés ont été remplacés par des acides aminés équivalents. Par acides aminés équivalents, on entend des acides aminés présentant un comportement chimique analogue et/ou des poids moléculaires voisins. Elles comprennent également les séquences codant pour une protéine dans
20 laquelle un ou plusieurs acides aminés non essentiels à l'activité ont été délétés ou remplacés.

Le génome peut être de type nucléaire ou mitochondrial.

Lorsque la séquence est présente dans le génome nucléaire, celui-ci comportera en outre une préséquence permettant l'importation dans les
25 mitochondries du produit de traduction de ladite séquence.

De préférence, le génome recombiné est un génome mitochondrial. L'invention a donc également pour objet une mitochondrie comportant un génome recombiné tel que défini précédemment.

En particulier, l'invention a pour objet une mitochondrie
30 caractérisée en ce qu'elle contient au moins un fragment nucléotidique de 347 pb, portée par la séquence orf 522, ou une séquence présentant au moins 90% d'homologie avec ledit fragment.

La séquence de 347 pb est délimitée, à l'intérieur de la séquence orf 522 (Köhler et al, Mol. Gen. Genet 1991), par les amorces de séquences :

5' CCCCCTCCCTGGTGGATCCGGCG 3'
5' CCCTCTATGAGTACCGTTCTCTCACG 3'

L'invention concerne un cytoplasme végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il contient un noyau comportant le génome du genre *Cichorium*, et un génome recombiné défini ci-dessus, en particulier un cytoplasme qui contient des mitochondries comportant une séquence nucléotidique portée par la séquence orf 522 de *Helianthus annuus*, ou par une séquence présentant au moins 50% d'homologie.

Des cellules végétales recombinées contenant un tel cytoplasme sont comprises dans l'invention, et notamment une cellule végétale qui contient un noyau comportant substantiellement le génome d'une espèce choisie parmi *Cichorium intybus* et *Cichorium endivia*.

Parmi ces espèces, on peut citer, sans aucunement y limiter l'invention, les cultigroupes suivants :

- 20 *Cichorium intybus* L :
- chicorées "sauvages améliorées"
 - chicorées "Barbe de Capucin"
 - chicorées "Pain de Sucre"
 - chicorées "Chioggia"
 - chicorées "Vérone"
 - 25 - chicorées "Catalogne"
 - chicorées "Trévise"
 - chicorées "Variegato di Castelfranco"
 - chicorées "Witloof" (ou "de Bruxelles" ou "à chicon")
 - 30 - chicorées "Soncino"
 - chicorées "Industrielles" (à torréfier et à sucres)
 - chicorées "fourragères" ou "à gibiers"...

Cichorium endivia L. : - chicorées "scaroles"
 - chicorées "frisées"...

5 Ce sont des chicorées dites à grosses racines (industrielles
fourragères et Witloof) ou des chicorées dites à salade (vertes, rouges,
panachées, à forcer ou non).

10 L'homme du métier pourra adapter sans difficulté l'invention,
notamment en se référant à "Génétique et Amélioration de la Chicorée
industrielle", DESPREZ et al., Séance spécialisée du 30 novembre 1994 à
l'Académie d'Agriculture de France n° 80 (7) 48-49.

15 Selon un autre aspect, l'invention se rapporte à un procédé pour
produire une plante du genre des Chicorées ou du matériel de reproduction
de cette plante, présentant une stérilité mâle cytoplasmique, caractérisé
en ce qu'on intègre dans le génome cellulaire de cette plante une
séquence nucléotidique portée par la séquence orf 522 du tournesol, ou par
une séquence présentant au moins 50% et de préférence au moins 90%
d'homologie avec ladite séquence orf 522. La plante (ou le matériel de
reproduction), à l'exception des variétés végétales, est comprise dans
l'invention.

20 Elle concerne également un procédé essentiellement non
biologique de préparation de plantes hybrides, caractérisé en ce qu'on
croise une plante susceptible d'être obtenue par le procédé décrit ci-
dessus, avec une plante de la même espèce, dépourvue de la séquence orf
522 de *Helianthus annuus*, ou d'une séquence présentant au moins 90%
d'homologie avec ladite séquence orf 522.

25 Selon encore un autre aspect, l'invention concerne un procédé de
sélection d'une stérilité mâle cytoplasmique chez une plante du genre
Cichorium, caractérisé en ce qu'on met en contact l'acide nucléique
mitochondrial de la plante avec une sonde marquée comprenant au moins
30 10 nucléotides de la séquence orf 522.

D'autres variantes et caractéristiques de l'invention apparaîtront à
la lecture des exemples qui suivent.

Exemple 1 : Préparation du matériel végétal

Des graines de *Cichorium intybus* L. cv Pévèle ont été fournies par les Etablissements Florimond Desprez et des graines de *Helianthus annuus* (à stérilité mâle cytoplasmique ou SMC) ont été achetées dans le commerce.

Les graines de *Cichorium intybus* ont été stérilisées en surface avec une solution à 0,1% (p/v) de HgCl_2 , lavées trois fois dans de l'eau distillée et placées dans des boîtes de Pétri sur un milieu de culture Heller (1953) (sels majeurs et mineurs exempts de FeCl_3) supplémentées avec 19,5 mg/l de Fe-
10 EDTA, 20 g/l de saccharose et 6 g/l d'Agar (Bioakar type E) et cultivées dans les conditions de culture décrites par Rambaud et al (1990). Les semis aseptiques ont été ensuite transférés dans des tubes de culture sur le même milieu. Les semences de *Helianthus annuus* ont été stérilisées avec une
15 solution d'hypochlorure de calcium à 50 g/l, puis lavées trois fois dans de l'eau distillée et transférées dans une solution saccharose (10 g/l) / agar (0,6%).

Les feuilles de chicorée ont été récoltées sur des plantes de 12 à 14 jours. Les feuilles ont été coupées en morceaux et incubées dans une solution contenant 15 g/l de caylase 345, 0,5 g/l de caylase M2 (Cayla,
20 Toulouse, France) et 90 g/l de mannitol.

Pour les semis de tournesol, les hypocotyles ont été prélevés 6 à 10 jours après la germination et incubés dans la même solution de macération.

Les protoplastes ont été incubés pendant 5 h 30 min. à 30° C dans
25 l'obscurité sans agitation, purifiés par filtration à travers des tamis à mailles de 50 μm , récoltés et lavés trois fois par centrifugation à basse vitesse (100 x g) pendant 15 min.

Après l'élimination de la couche supérieure avec une pipette Pasteur, les protoplastes ont été mélangés dans le rapport 1:3
30 (tournesol/chicorée) afin d'obtenir une suspension contenant entre 7 et 11.10⁶ protoplastes/ml.

Les protoplastes ont été fusionnés selon la méthode de Kao (Wetter LRL and Constabel F (eds) Plant Tissue Culture Methods, ch 7, pp 49-56, 1982) avec les modifications suivantes : un volume d'une solution de mélange de protoplastes a été placé dans une boîte de Pétri et trois volumes de solution à 30% de polyéthylène glycol (PEG 4000 Serva) avec 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été ajoutés goutte à goutte. Après une homogénéisation douce, on a laissé la solution reposer pendant trois minutes. Une minute plus tard on ajoute à nouveau 3,5 volumes de la solution numéro 3 de Kao (1982). Puis 3,5 volumes de solution numéro 3 de Kao (1982) sont ajoutés et 3 min plus tard 6 x 3,5 volumes de milieu de lavage (Saksi N et al. CR Acad. Sci. Paris 302 : 165-170, 1986) sont ajoutés. On récupère les protoplastes après 10-15 min, par centrifugation (8 min, 100 x g) ; ils sont ensuite lavés 3 fois par des aliquots de 8 ml du milieu de lavage et remis en suspension dans le milieu de culture MC1 (Saksi et al, 1986) dans lequel la concentration d'acide 1-naphthylacétique (NAA) est de 2 mg/l, celle de l'inositol 250 mg/l et de KNO₃ 144 mg/l.

Après un ou deux jours de culture dans ce milieu à une densité de 2.10⁴ protoplastes/ml, les hétérokaryocytes isolés sont cultivés à basse densité (12/100 µl) à 30° C dans un milieu MC1 modifié (0,5 mg/l NAA) auxquels sont ajoutés de l'acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES) (5 mM), de l'hydrolysate de caséine (150 mg/l) et du lait de coco (2% ; v/v).

Un mois plus tard, les colonies dérivées des fusions de protoplastes hétéroplasmiques sont transférées sur un milieu de prolifération puis sur un milieu de régénération (Rambaud et al. 1990). Après enracinement, les plantes ont été transférées en serre pour quelques semaines puis transplantées dans les champs.

Les plantes obtenues présentent un phénotype de chicorée. Parmi celles-ci, la lignée désignée par CT 52/3 présente une stérilité mâle par défaut de déhiscence des anthères ; la lignée CT 41/1 présente une stérilité mâle par absence complète d'anthère.

Exemple 2

Matériels et méthodes

Matériel végétal

5 Seize populations de chicorées industrielles à cytoplasme normal numérotées FD1 à FD16, la chicorée industrielle cv. Pévèle, et une famille de chicorée industrielle (CT 41/1) 20540 U à stérilité mâle cytoplasmique (SMC) fournies par la société Florimond-Desprez, une chicorée CT 52/3 (SMC), le tournesol cv. Mirasol (SMC). Les jeunes feuilles ont été prélevées
10 sur des plantules élevées en serre et conservées à -80° C.

ADN

Adaptation des protocoles du Laboratoire de Dellaporta (Plant. Mol. Report., 1983) pour la miniextraction d'ADN total : les opérations ont lieu à
15 4° C. Broyer finement avec de l'azote liquide un fragment foliaire de 150 à 200 mg en poids frais. Transférer dans un microtube de 2 ml. Ajouter 940 µl de solution tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 50 mM, NaCl 0,5 M, β-mercaptoéthanol 10 mM. Ajouter 62 µl de SDS 20% et vortexer vigoureusement. Incuber à 65° C pendant 15 min. Ajouter 310 µl d'acétate
20 de potassium 5 M et vortexer vigoureusement. Laisser précipiter pendant 30 min. Centrifuger. Centrifuger 15 min à 17.500 g. Transférer 1 ml du surnageant dans un microtube de 2 ml. Ajouter 0,5 ml d'isopropanol et mélanger. Laisser précipiter pendant 15 min. Centrifuger 10 min à 12.000 g. Décanter le surnageant avec une micropipette. Sécher les culots dans un
25 appareil Speed-Vac pendant 10 min en position basse température. Redissoudre les culots dans 100 µl de solution tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, ribonucléase A 0,2 mg/ml et incuber 2h à 37° C. Réaliser trois extractions phénoliques suivies d'une extraction au chloroforme. Ajouter 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et deux volumes
30 d'éthanol absolu à 4° C. Laisser précipiter 15 min à 4° C. Centrifuger 10 min à 12.000 g. Rincer le culot avec de l'éthanol 70% à 4° C. Centrifuger 3 min à 12.000 g. Décanter avec une micropipette et sécher au Speed-Vac pendant 10 min à basse température. Reprendre le culot dans une solution tampon Tris-HCl 1 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM.

Quantification à partir d'un aliquot de 5 µl par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 0,8%, TBE 1x, BET 0,5 µg/ml.

PCR

- 5 Deux amorces de 23 et 26 bases qui délimitent un fragment de 347 pb interne à la séquence orf 522 (Köhler et al., Mol. Gen. Genet., 1991). Séquences des amorces :

5'CCCCCTCCCTGGTGGATCCGGCG 3'

5'CCCTCTATGAGTACCGTTCTCTCACG3'

- 10 Progamation du thermocycleur 60 Bio-Med : premier cycle : 3 min, 92° C ; 30 cycles : 1.30s, 92° C ; 2.30s, 55° C ; 3.1 min, 72° C ; dernier cycle : 5 min, 72° C. Milieu réactionnel : Tampon Appligène 1x : Tris-HCl 10 mM pH 9.0. Triton X-100 0,1%, MgCl₂ 1,5mM, BSA 0,2 mg/ml ; dNTP 100 µM ; amorces 0,2 µM chacune ; Taq polymérase Appligène 2 U/100 µl ; ADN matrice 50
15 ng/ 100 µl ; H₂O QSP 10 µl ; huile minérale : 50 µl. Analyse des produits par électrophorèse horizontale en gel d'agarose 1,6% TBE 1x, BET 0,5 µg/ml.

Hybridations

- 20 Technique classique de transfert par la méthode de Southern ("Maniatis"). Marquage chimique de la sonde orf 522 avec le kit Dig-High-Prime (Boehringer-Mannheim). Révélation selon le protocole Boehringer-Mannheim avec le CSPD (Tropix) comme substrat chimioluminescent. Durée d'exposition des membranes : de une heure à une nuit pour les
25 fragments très faiblement amplifiés.

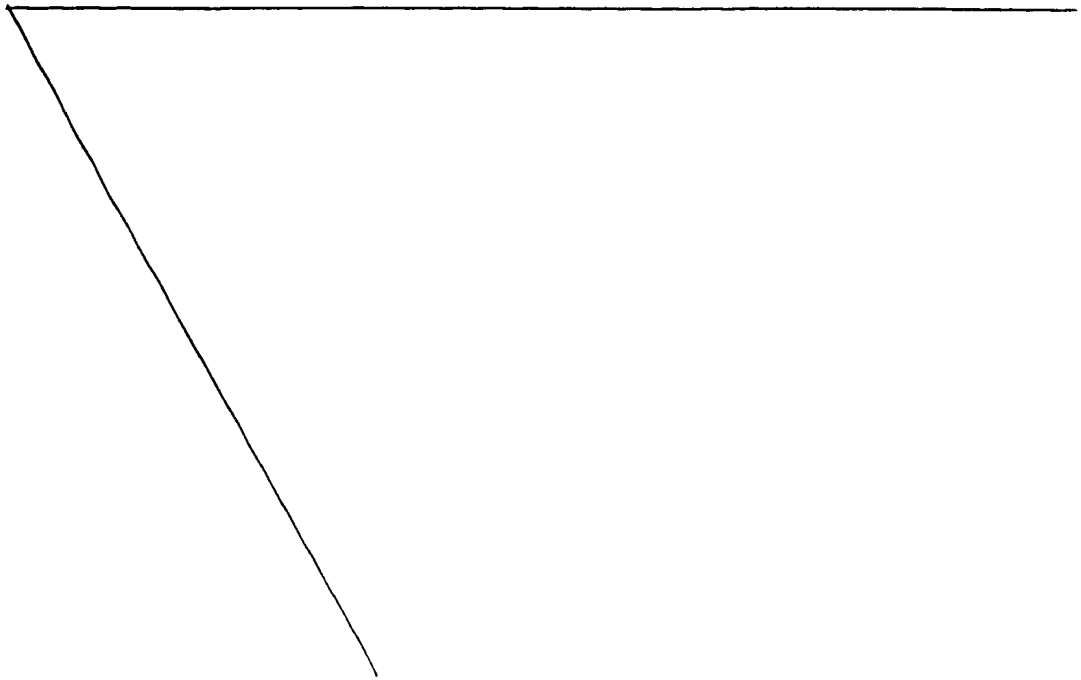
Résultats

- Les ADN totaux de 4 individus par population FD1 à FD16, de 8
individus de la famille 20540 U, de la chicorée CT 52/3 et du tournesol "Mirasol", ont été extraits, soit au total 73 individus. L'absence d'inhibition
30 de la PCR par des impuretés présentes dans les extraits d'ADN a été vérifiée en ajoutant quelques dizaines de femtogrammes du fragment de 347 pb à chaque milieu réactionnel. Les analyses PCR de l'ADN 52/3, de l'ADN tournesol "Mirasol", et des ADN de la famille 20540 U permettent toutes

l'amplification d'une quantité importante (200 ng approx.) du fragment de 350 pb environ de l'orf 522. Ce fragment est absent chez toutes les chicorées à cytoplasme normal. L'analyse de ces produits PCR par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde orf 522 préparée par PCR à partir d'ADN total de tournesol Mirasol confirme l'homologie entre le fragment amplifié chez les chicorées (SMC) et la sonde.

Conclusion

10 Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'orf 522 n'est pas présente chez les chicorées fertiles. La détermination par PCR de la présence/absence de la séquence orf 522 peut donc être envisagée pour l'analyse de routine.



REVENDICATIONS

feuille avant rectification

5 1. Génome végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte des gènes spécifiques des chicorées et une séquence nucléotidique conférant une stérilité mâle, portée par la séquence orf 522 de tournesol (*Helianthus annuus*), ou par une séquence présentant au moins 50% d'homologie avec ladite séquence orf 522.

10 2. Mitochondrie, caractérisée en ce qu'elle comporte un génome recombiné selon la revendication 1.

3. Mitochondrie selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un fragment nucléotidique de 347 pb, portée par la séquence orf 522, ou une séquence présentant au moins 50% d'homologie avec ledit fragment.

15 4. Cytoplasme végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il contient un noyau comportant le génome du genre *Cichorium*, et un génome recombiné selon la revendication 1.

20 5. Cytoplasme selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il contient des mitochondries comportant une séquence nucléotidique portée par la séquence orf 522 de *Helianthus annuus*, ou par une séquence présentant au moins 50% d'homologie.

6. Cytoplasme selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il contient des mitochondries selon la revendication 3.

25 7. Cellule végétale recombinée, caractérisée en ce qu'elle contient un cytoplasme selon l'une des revendications 4 à 6.

8. Cellule végétale selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle contient un noyau comportant substantiellement le génome d'une espèce choisie parmi *Cichorium intybus* et *Cichorium endivia*.

30 9. Procédé pour produire une plante du genre des Chicorée ou du matériel de reproduction de cette plante, présentant une stérilité mâle cytoplasmique, caractérisé en ce qu'on intègre dans le génome cellulaire de cette plante une séquence nucléotidique portée par la séquence orf 522 de *Helianthus annuus*, ou par une séquence présentant au moins 50% d'homologie avec ladite séquence orf 522.

10. Utilisation de la séquence orf 522 de *Helianthus annuus* ou d'une séquence présentant au moins 90% d'homologie avec la séquence orf 522, pour conférer une stérilité mâle cytoplasmique à une plante du genre *Cichorium*.

5 11. Procédé essentiellement non biologique de préparation de plantes hybrides, caractérisé en ce qu'on croise une plante susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 9, avec une plante de la même espèce, dépourvue de la séquence orf 522 de *Helianthus annuus*, ou
10 d'une séquence présentant au moins 90% d'homologie avec ladite séquence orf 522.

15 12. Procédé de sélection d'une stérilité mâle cytoplasmique chez une plante du genre *Cichorium*, caractérisé en ce qu'on met en contact l'acide nucléique mitochondrial de la plante avec une sonde marquée comprenant au moins 10 nucléotides de la séquence orf 522.

CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

REVENDICATIONS

1. Génome végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte des
5 gènes spécifiques des chicorées et une séquence nucléotidique conférant
une stérilité mâle, portée par la séquence orf 522 de tournesol (*Helianthus
annuus*), ou par une séquence présentant au moins 50% d'homologie avec
ladite séquence orf 522.

2. Mitochondrie, caractérisée en ce qu'elle comporte un génome
10 recombiné selon la revendication 1.

3. Mitochondrie selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle
contient au moins un fragment nucléotidique de 347 pb, portée par la
séquence orf 522, ou une séquence présentant au moins 50% d'homologie
avec ledit fragment.

4. Cytoplasme végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il contient un
15 noyau comportant le génome du genre *Cichorium*, et un génome
recombiné selon la revendication 1.

5. Cytoplasme selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il
contient des mitochondries comportant une séquence nucléotidique portée
20 par la séquence orf 522 de *Helianthus annuus*, ou par une séquence
présentant au moins 50% d'homologie.

6. Cytoplasme selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il
contient des mitochondries selon la revendication 3.

7. Cellule végétale recombinée, caractérisée en ce qu'elle contient
25 un cytoplasme selon l'une des revendications 4 à 6.

8. Cellule végétale selon la revendication 7, caractérisée en ce
qu'elle contient un noyau comportant substantiellement le génome d'une
espèce choisie parmi *Cichorium intybus* et *Cichorium endivia*.

9. Procédé pour produire une plante du genre des Chicorée ou du
30 matériel de reproduction de cette plante, présentant une stérilité mâle
cytoplasmique, caractérisé en ce qu'on intègre dans le génome cellulaire
de cette plante une séquence nucléotidique portée par la séquence orf 522
de *Helianthus annuus*, ou par une séquence présentant au moins 50%
d'homologie avec ladite séquence orf 522.

10. Utilisation de la séquence orf 522 de *Helianthus annuus* ou d'une séquence présentant au moins 90% d'homologie avec la séquence orf 522, pour conférer une stérilité mâle cytoplasmique à une plante du genre *Cichorium*.

- 5 11. Procédé de sélection d'une stérilité mâle cytoplasmique chez une plante du genre *Cichorium*, caractérisé en ce qu'on met en contact l'acide nucléique mitochondrial de la plante avec une sonde marquée comprenant au moins 10 nucléotides de la séquence orf 522.